

## **FICHE PROTOCOLE N° 2**

### **Séparation de la gélatine par exclusion moléculaire**

Le fractionnement sera réalisé sur une colonne « Hitrap Desalting » de « GE Healthcare ». Les caractéristiques complètes de la colonne sont rassemblées dans le document technique « GE HealthCare ».

#### **Matériels et réactifs**

- **Echantillon « B »**
- Colonne Hitrap Desalting de GE Healthcare
  - Mini-colonne de gel d'exclusion moléculaire
  - Nature du gel : Sephadex® G-25, domaine de fractionnement 1000-5000 g/mol
  - Volume de la colonne : 5 mL
- Potence + noix de serrage + petite pince 3 doigts
- Tampon d'élution :  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  à 50 mmol/L et pH = 7,0
- Ethanol à 20%
- Seringues de 1 mL et 25 mL + adaptateur « luer lock »
- Tubes Eppendorf de 1 mL pour la récupération de l'éluant
- Balance
- Pipettes automatiques 1000 + cônes

#### **Protocole opératoire**

##### **1. Préparation et équilibrage de la colonne**

Fixer la colonne.

Enlever le capuchon supérieur de la colonne et déposer quelques gouttes de tampon de façon à former un ménisque et éviter l'introduction de toute bulle d'air lors de l'adaptation de la seringue.

Prélever 25 mL de tampon d'élution avec la seringue, purger les éventuelles bulles d'air.

Fixer l'adaptateur Hitrap « luer lock » sur la seringue et purger de nouveau.

Visser alors l'ensemble avec précaution au sommet de la colonne, en prenant soin de ne pas emprisonner de bulles d'air.

Ouvrir la sortie de la colonne.

Laver la colonne de la solution de conservation qu'elle contient et équilibrer avec le tampon selon les recommandations du fournisseur.

##### **2. Chromatographie de l'échantillon « B »**

Préparer une série de 15 tubes Eppendorf pour le recueil des fractions.

Prélever l'échantillon B dans une seringue appropriée, éliminer les éventuelles bulles d'air, et adapter cette seringue en haut de la colonne, à la place de celle contenant le tampon, en respectant les mêmes consignes.

Injecter alors doucement 1 mL de l'échantillon « B » dans la colonne.

A partir de ce stade, éluer avec environ 10 mL de tampon et recueillir l'effluent par fractions de 20 gouttes dans la série des 15 tubes Eppendorf.

##### **3. Régénération et conservation de la colonne**

Pour la conservation, faire passer ensuite dans la colonne environ 25 mL d'une solution d'éthanol à 20%. Fermer le bas de la colonne avec le bouchon prévu.

Enlever l'adaptateur « luer lock » en haut de la colonne et revisser le bouchon en prenant soin de ne pas emprisonner de bulle d'air.

Conserver à 4°C (éventuellement dans un flacon fermé contenant de l'éthanol à 20%).